PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-075892
(43)Date of publication of application : 23.03.1999

---

(51)Int.Cl. C12Q 1/04
G01N 15/14

---

(21)Application number : 09-250759
(22)Date of filing : 16.09.1997

(71)Applicant : TOA MEDICAL ELECTRONICS CO LTD
(72)Inventor : AKAI YASUMASA
SAITO ATSUKO

---

(54) DETECTION OF MALARIA PARASITE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To quickly and specifically detect malaria parasites without passing through a centrifugal separation process by hemolyzing a specimen with a hemolyzing agent, dyeing liberated malaria parasites with a dye for dyeing nucleic acids and subsequently measuring the dyed malaria parasites by a flow cytometry.
SOLUTION: This method for detecting malaria parasites comprises hemolyzing erythrocytes in a specimen with a reagent containing a surfactant and used for measuring the malaria parasites, removing non-infected erythrocytes and net-like erythrocytes from the treated specimen, dyeing the liberated malaria parasites with a nucleic acid-dyeable fluorescent dye and subsequently measuring the fluorescent dyed malaria parasites with a flow cytometer to classify the life history of the malaria parasites.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁（ＪＰ）

(12) **公開特許公報**（Ａ）

(11)特許出願公開番号
特開平11－75892

(43)公開日　平成11年(1999)３月23日

(51)Int.Cl.^{6}	識別記号	ＦＩ	
Ｃ１２Ｑ　1/04		Ｃ１２Ｑ　1/04	
Ｇ０１Ｎ　15/14		Ｇ０１Ｎ　15/14	Ｃ

審査請求　未請求　請求項の数６　ＯＬ　（全７頁）

(21)出願番号　特願平9－250759

(22)出願日　平成９年(1997)９月16日

(71)出願人　390014960
シスメックス株式会社
神戸市中央区脇浜海岸通１丁目５番１号

(72)発明者　赤井　保正
兵庫県神戸市中央区港島中町７丁目２番地の１　東亜医用電子株式会社内

(72)発明者　斎藤　あつ子
兵庫県神戸市中央区熊内町２丁目４－12
グランフォルム新神戸202号

(74)代理人　弁理士　社本　一夫　（外５名）

(54)【発明の名称】　マラリア原虫の検出方法

(57)【要約】
【課題】　マラリア原虫を迅速かつ簡単に、遠心分離操作無しにフローサイトメータで検出する方法を提供する。

【解決手段】　試料中の赤血球を界面活性剤を含むマラリア原虫測定用試薬で溶解してマラリア原虫を遊離させ、遊離したマラリア原虫を核酸染色性色素を用いて染色し、染色した試料をフローサイトメトリにより測定することからなるマラリア原虫の検出方法。

【特許請求の範囲】

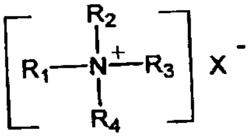
【請求項１】　試料中の赤血球を界面活性剤を含むマラリア原虫測定用試薬で溶解してマラリア原虫を遊離させ、遊離したマラリア原虫を核酸染色性色素を用いて染色し、染色した試料をフローサイトメトリにより測定することからなるマラリア原虫の検出方法。

【請求項２】　界面活性剤が、アニオン性界面活性剤、ノニオン性界面活性剤およびカチオン性界面活性剤からなる群より選ばれる請求項1記載のマラリア原虫の検出方法。

【請求項３】　界面活性剤が、以下の一般式a又はbで表されるカチオン性界面活性剤である請求項1または2記載のマラリア原虫の検出方法。

一般式a

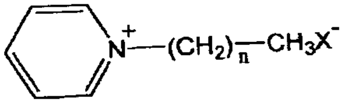
【化１】



［式中、R_1：C_8～C_{20}のアルキル基、アルケニル基又はアルキニル基；R_2，R_3およびR_4：C_1～C_8のアルキル基、アルケニル基又はアルキニル基；X^-：陰イオン基］

一般式b

【化２】



［式中、n：7～19の整数；X^-：陰イオン基］

【請求項４】　シースフロー中を流れる細胞に励起光を照射し、細胞が発する散乱光強度と蛍光強度を測定することにより実施する請求項1記載のマラリア原虫の検出方法。

【請求項５】　分裂小体，輪状体，分裂体及び生殖母体からなる群より選ばれる１以上のマラリア原虫の生活史を検出することによりマラリアの種類を同定することを含む請求項1記載のマラリア原虫の検出方法。

【請求項６】　アニオン性界面活性剤、ノニオン性界面活性剤およびカチオン性界面活性剤からなる群より選ばれる界面活性剤及び核酸染色性色素を含む、マラリア原虫検出用キット。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

【発明の属する技術分野】本発明は、試料中のマラリア原虫を迅速かつ特異的に検出する方法に関する。

【０００２】

【従来の技術】マラリアは熱帯・亜熱帯地方に広く分布する寄生虫感染症である。その病原体は胞子虫類に分類されるマラリア原虫であり、ハマダラカに媒介され感染

する。ＷＨＯの統計によれば世界人口の４０％以上が居住する９０ヶ国がその汚染地である。そのため年間３～５億人程度が罹患し、死亡者は１５０～３００万人に至っている。

【０００３】マラリアの症状としては特有の熱発作とそれに引き続いて起こる脾腫や貧血を呈する。特に悪性マラリアと呼ばれる熱帯熱マラリアにおいては、発症後数時間以内に治療を開始しないと重篤な症状や合併症に陥り死に至る場合もある。このことから、マラリアの特に熱帯熱マラリアの早期の診断は重要である。

【０００４】マラリア原虫をもつハマダラカに吸血されると、ハマダラカの唾液とともに原虫のヒトへの感染型であるスポロゾイトが血中に注入される。スポロゾイトは血流により肝細胞に運ばれ、肝細胞内に侵入する。その後細胞分裂によりメロゾイト（分裂小体：merozoite）を形成し、血中に放出する。メロゾイトは血中にて直ちに赤血球内に侵入して赤内型の生活史を開始する。赤内型の生活史では輪状体（ring form）、栄養体（trophozoite）、分裂体（schizonte）と発育しメロゾイトを赤血球外に放出する。このとき同時に赤血球の破壊を招く。血中に放出されたメロゾイトは新たに赤血球に侵入し、再び赤内型生活史を開始する。マラリア原虫はこのサイクルを繰り返すことにより増殖し、血中の赤血球を破壊し続ける。一方メロゾイトの一部は赤血球に感染することなく、生殖母体(gametocyte)と呼ばれる形態に分化する。生殖母体はハマダラカの吸血により更なる感染の母体となる。

【０００５】マラリアを診断する方法として、従来から目視による顕微鏡観察法が挙げられる。血液塗抹標本をギムザ染色し、顕微鏡で観察することによりマラリア原虫が感染している赤血球を検出する方法である。

【０００６】また、血液塗抹標本を核酸染色性蛍光色素を用いて染色し、蛍光顕微鏡で観察する方法も挙げられる。しかしこれらの方法では、塗抹標本の作成、固定、染色の工程を必要とし煩雑かつ時間が必要である。さらに顕微鏡観察には熟練を要し、多数の赤血球を観察するために多くの時間を費やす。このため多数検体を処理することは困難である。

【０００７】近年ＤＮＡプローブ、間接蛍光抗体法、間接赤血球凝集法等が開発されている。しかしこれらの方法はその操作が煩雑であり、時間もかかり、高価であることが問題である。

【０００８】前述の方法以外に、フローサイトメータを用いてマラリア感染赤血球を測定する方法が開発されている。これは核酸染色性色素により赤血球内のマラリア原虫を特異的に染色し、色素の励起光を照射することによりマラリア原虫からの蛍光を検出する方法である。

【０００９】J. W. Jacobbergerは蛍光色素として3, 3'-dimethyloxacarbocyanineを使用してフローサイトメータでマラリア感染赤血球を検出する方法を開示している

(Cytometry,Vol. 5 : 589-600, 1984)。この文献では網状赤血球とマラリア感染赤血球がスキャッタグラム上で重なった領域に出現することが示唆されている。

【0010】M.T.Maklerらは蛍光色素としてThiazole Orangeを使用してマラリア感染赤血球を検出する方法を開示している（Cytometry, Vol. 8 : 568-570, 1987）。この文献においても網状赤血球がマラリア感染赤血球に影響を及ぼすことが記載されている。

【0011】J.M.WhaumらはAcridine Orangeを使用してマラリア感染赤血球を検出する方法を開示している（Cytometry, Vol. 4 : 117-122, 1983）。Acridine Orangeは、DNAに結合したときは緑蛍光を、RNAと結合したときは赤蛍光を発する。この文献ではこの性質を用いて、DNAとRNAの両方をもつマラリア感染赤血球とRNAのみをもつ網状赤血球を弁別することが可能であると記載されている。

【0012】特開平6-300753号では、色素としてオーラミンOと3,3'-diethyl-2,2'-oxacarbocyanine iodideを使用してマラリア感染赤血球を検出する方法が開示されている。この方法では低濃度のオーラミンOによりマラリア感染赤血球のみを染色し、3,3'-diethyl-2,2'-oxacarbocyanine iodideにより全体的な蛍光強度を増強し検出可能とした。しかしこの方法ではマラリア未感染赤血球と感染赤血球の弁別は十分明確ではない。

【0013】上記に記載されている方法は、網状赤血球の影響、マラリア未感染赤血球と感染赤血球の弁別が十分でないという問題に加えて、計数するマラリア感染赤血球数が少ないことに由来する絶対的な感度が不十分である。

【0014】これに対しP.H.Vianenらは、赤血球を、緩衝剤、ホルムアルデヒドおよびジエチレングリコールを含む溶血剤を用いて溶血し、マラリア原虫を遊離した後、色素としてHoechst 33258を使用してマラリア原虫を染色し、フローサイトメータで検出する方法を開示した（Cytometry, Vol. 14 : 276-280, 1993）。この方法ではマラリア未感染赤血球や網状赤血球の影響は無視することができるものの、溶血、染色操作が煩雑であり、数十分以上の時間が必要という問題がある。

【0015】英国特許GB2,270,752では、血液試料から赤血球のみを分離するため遠心分離を行い、化学物質あるいは超音波による溶血処理後、既知の計数法により検出を行う方法が開示されている。この方法は遠心分離操作が必要であり、煩雑かつ時間が必要である。またこの方法は、細胞の大きさを測定することにより検出を行っている。

【0016】これらの溶血により遊離したマラリア原虫を計数する方法では遠心分離、溶血操作という前処理が必要であり、染色にも数十分以上必要という問題がある。

【0017】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、溶血処理によりマラリア原虫を遊離させ、核酸染色性色素を用いてマラリア原虫を迅速に特異染色し、遠心分離操作無しにフローサイトメータで検出する方法を提供することである。

【0018】

【課題を解決するための手段】本発明によれば、試料を溶血剤により溶解処理を行うことによって、赤血球中のマラリア原虫を遊離すると同時に、未感染赤血球・網状赤血球の除去を行う。その後、マラリア原虫を核酸染色性蛍光色素にて染色を行い、フローサイトメータに導入し検出を行う。

【0019】すなわち、溶血剤としての界面活性剤及び核酸染色性色素を含むマラリア原虫測定用試薬と、マラリア原虫を含む試料をマラリア原虫が特異的に染色される条件において混合することにより、試料中のマラリア原虫を蛍光染色する工程及び蛍光染色されたマラリア原虫を個々に検出する工程からなるマラリア原虫検出方法を提供する。

【0020】

【発明の実施の形態】核酸染色性色素としては、核酸を染色できる蛍光色素であれば特に限定はされるものではない。例えば、Acridine Orange, Thiazole Orange, Ethidium Bromide, Propidium Iodide, Auramine O, Hoechst 33258, Hoechst 33342, Rhodamine 123, DiOC1(3)などがあげられる。なお、これらは、光源としてアルゴンレーザ(488nm)を使用する場合に使用できる蛍光色素である。他の波長の光源、例えば赤色レーザなどを使用する場合には、それに合わせて使用可能な色素を適宜選択すればよい。他の色素としては、Acridine homodimer, Actinomycin D, 7-Aminoactinomycin D(7-AAD), 9-Amino-6-chloro-2-methoxyacridine(ACMA), BOBO-1, BOBO-3, BO-PRO-1, BO-PRO-3, 4',6-Diamidino-2-phenylindole(DAPI), Dihydroethidium, 4',6-(Diimidazolin-2-yl)-2-phenylindole, Ethidium-acridine heterodimer, Ethidium diazide, Ethidium homodimer-1, Ethidium homodimer-2, Ethidium monoazide, Hexidium iodide, Hydroxystilbamidine, methanesulfonate, LDS 751, OliGreen ssDNA quantitation reagent, PicoGreen dsDNA quantitation reagent, PO-PO-1, PO-PO-3, PO-PRO-1, PO-PRO-3, SYTO 11 live-cell nucleic acid stain, SYTO 12 live-cell nucleic acid stain, SYTO 13 live-cell nucleic acid stain, SYTO 14 live-cell nucleic acid stain, SYTO 15live-cell nucleic acid stain, SYTO 16 live-cell nucleic acid stain, SYTO20 live-cell nucleic acid stain, SYTO 21 live-cell nucleic acid stain,SYTO 22 live-cell nucleic acid stain, SYTO 23 live-cell nucleic acid stain, SYTO 24 live-cell nucleic acid stain, SYTO 25 live-cell nucleic acidstain, SYTO 17 red fluorescent nucleic acid

stain, SYTOX Green nucleicacid stain, TO-PRO-1, TO-PRO-3, TO-PRO-5, TO-TO-1, TO-TO-3, YO-PRO-1, YO-PRO-3, YO-YO-1, YO-YO-3等が挙げられる。これらは、Molecular Probes, Inc.より入手できる。

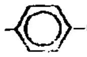
【0021】核酸染色性色素の量は使用する色素の種類によって異なるが、一般に試薬全量に対して0.001～10000ppm、好ましくは0.005～1000ppm、より好ましくは0.01～500ppmである。

【0022】界面活性剤は、赤血球を溶解する作用とともにマラリア原虫への色素の透過性を向上する作用がある。界面活性剤の種類は一般に赤血球を溶解する作用があるものであれば特に限定されるものではないが、アニオン性界面活性剤、ノニオン性界面活性剤やカチオン性界面活性剤が好適に使用される。

【0023】例えばアニオン性界面活性剤では、一般式

R1-R2-(CH2CH2O)$_n$-X

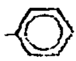
【化3】

［ここで、R$_1$は炭素数10～22のアルキルまたはアルケニルまたはアルキニル基；R$_2$はO, --O-またはCOO；nは8～30の整数；XはSO$_3$Na, COONa, OSO$_3$NaまたはONa］

で表されるポリオキシエチレン系アニオン界面活性剤が、ノニオン性界面活性剤では、一般式

R1-R2-(CH2CH2O)$_n$-H

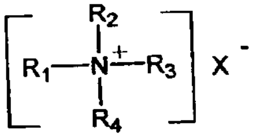
【化4】

［ここで、R$_1$は炭素数10～22のアルキルまたはアルケニルまたはアルキニル基；R$_2$はO, --O-またはCOO；nは8～30の整数］

で表されるポリオキシエチレン系ノニオン性界面活性剤が使用できる。上述のアニオン性界面活性剤およびノニオン性界面活性剤の濃度は、0.01～15%、好ましくは0.05～10%の範囲で好適に使用される。

【0024】また、カチオン性界面活性剤では、一般式a

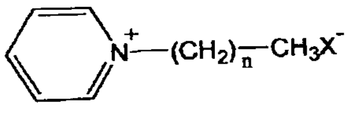
【化5】



［式中、R1：C_8～C_{20}のアルキル基、アルケニル基又はアルキニル基；R_2, R_3およびR_4：C_1～C_8のアルキル基、アルケニル基又はアルキニル基；X^-：陰イオン基］

一般式b

【化6】



［式中、n：7～19の整数；X^-：陰イオン基］で表されるカチオン性界面活性剤が使用できる。好ましいR_1としては、オクチル基、デシル基、ラウリル基、ミリスチル基及びセチル基が挙げられる。好ましいR_2～R_4としては、メチル基、エチル基、プロピル基及びイソプルピル基が挙げられる。好ましい陰イオン基は、F^-, Cl^-, Br^-, I^-などのハロゲンイオンの他に、$CF_3SO_3^-$, BF_4^-, ClO_4^-などを含む。

【0025】界面活性剤としてはカチオン性界面活性剤が特に好適である。具体的には、オクチルトリメチルアンモニウムブロマイド（OTAB），デシルトリメチルアンモニウムブロマイド（DTAB），ラウリルトリメチルアンモニウムクロライド（LTAC），ミリスチルトリメチルアンモニウムブロマイド（MTAB）、セチルピリジニウムクロライド（CPC）などが挙げられる。

【0026】カチオン性界面活性剤濃度は、界面活性剤に含まれるR_1～R_4の総炭素数が増えるごとに、溶血力が強くなることを考慮して決定すべきである。過剰な界面活性剤濃度はマラリア原虫までも溶解するため好ましくない。本発明においては、例えば、MTAB（総炭素数17）では300～3000ppm, LTAC（総炭素数15）では300～10000ppm, DTAB（総炭素数13）では5000～20000ppm, OTAB（炭素数11）では21000～40000ppmが好適である。

【0027】本発明の試薬には，ｐＨを一定に保つための緩衝剤を含有することが出来る。緩衝剤はｐＨを一定に保つことにより、安定したマラリア原虫の染色結果を得るために使用される。通常数ｍＭから100ｍＭ程度の濃度で使用される。緩衝剤の種類は通常使用されるものであれば限定されるものではないが、染色するのに好適なｐＨに応じて、例えば、カルボン酸類，リン酸，トリシンなどのグッドの緩衝剤，タウリンなどを使用することが出来る。好適なｐＨは使用する色素によって異なるが、3～11の範囲、好ましくは４～９の範囲がよい。

【0028】また本発明の試薬には浸透圧補償剤を含有することが出来る。浸透圧はマラリア原虫の低張溶解を防止するために通常150～600mOsm/kgの範囲に調整されていることが望ましい。浸透圧補償剤は特に制限されるものではないが、例えばプロピオン酸等のアルカリ金属塩、グルコース、マンノース等の糖類が好適である。NaClのようなアルカリ金属ハロゲン化物やアルカリ土類金属ハロゲン化物も使用できる。さらに多価アニオンを使

用することもできる。多価アニオンとしては、硫酸イオン、リン酸イオン、炭酸イオン及び多価カルボン酸イオンが特に好適であり、これらを供給し得る化合物としては、例えば、クエン酸、硫酸、リン酸、EDTAやこれらのアルカリ金属塩等が挙げられる。

【００２９】なお、緩衝剤で測定に適した浸透圧が維持できる場合には、緩衝剤を浸透圧補償剤としても使用することができる。

【００３０】さらに本試薬には、上記構成要素以外にも、必要に応じて防腐剤を含有することが可能である。例えば2-ピリジルチオ-1-オキシドナトリウムあるいはβ－フェネチルアルコールが挙げられる。

【００３１】本発明の方法に使用する試薬は上記各種成分を含む１液構成とすることができるが、核酸染色性色素が水溶液中で不安定な場合には、色素を適当な水溶性の非水溶媒、例えばエタノール，ジメチルスルホキシドあるいはエチレングリコール等に溶解して保存し、使用時に他の成分を含有する水溶液と混合して使用することが可能である。

【００３２】本発明の方法に用いる試薬を血液試料と混合すると、速やかに赤血球の溶血が行われ、同時に核酸の染色が行われる。即ち、感染赤血球の溶血によりマラリア原虫が遊離してその核酸が染色される。また、未感染赤血球や網状赤血球も同時に溶血され、デブリスとなる。この場合の反応温度は20～50℃が好適である。また、反応時間は反応温度が高いほど短時間であるが、５～300秒が好適である。より好適な条件は反応温度30～40℃であり、反応時間は5～30秒である。

【００３３】測定に使用する機器は従来より公知のフローサイトメータが使用可能である。光源は使用する色素に応じて選択されるべきである。試料の調製及び測定は以下の工程からなる。

【００３４】①マラリア原虫測定用試薬と血液試料を混合して測定用試料を調製する。
②測定用試料をフローサイトメータに導入する。
③シースフロー中を流れる細胞に励起光を照射し、細胞が発する散乱光と蛍光を測定する。
④散乱光強度と蛍光強度によりマラリア原虫と他の細胞成分を弁別する。
工程①における血液試料とは、測定対象となる血液成分である赤血球を含有する試料の全てを示す。例えば、抗凝固剤処理を行った末梢血液あるいはマラリア原虫を赤血球に感染させて培養した培養液である。工程③における散乱光は前方散乱光または側方散乱光のいずれでもよい。工程④において散乱光強度と蛍光強度によりマラリア原虫とデブリス（Debris：主に赤血球の残骸）を弁別し、蛍光強度によりマラリア原虫と白血球を弁別する。

【００３５】本発明の方法を用いると、マラリア原虫を赤血球デブリスや白血球などの成分から弁別できるだけでなく、マラリア原虫の生活史を分類計数することができる。３日熱マラリア，４日熱マラリア，卵型マラリアでは、in vitroの培養系及び患者の末梢血中で、全ての生活史が出現する。しかし熱帯熱マラリアでは、培養系では全ての生活史が出現するものの、末梢血中では輪状体と生殖母体しか出現しない。

【００３６】本発明の方法を用いると、これらのマラリア原虫の生活史の分類が可能である。即ち、散乱光強度と蛍光強度の違いにより、分裂小体，輪状体，分裂体，生殖母体を弁別することが可能である。この生活史の分類を用いることによりスキャッタグラムの出現パターンから、末梢血において輪状体，生殖母体しか出現しない熱帯熱マラリアと、全ての生活史が出現する他の３種のマラリアとの弁別が可能である。とくに、熱帯熱マラリアは発症後すみやかに治療を開始することが必要なことから、本発明の方法により迅速に測定できることは、早期に診断をする上できわめて有用である。

【００３７】さらに本発明はマラリア原虫検出用キットも提供する。本発明のキットには、アニオン性界面活性剤、ノニオン性界面活性剤およびカチオン性界面活性剤からなる群より選ばれる界面活性剤及び核酸染色性色素を含む。核酸染色性色素は１液構成としても２液構成としてもよい。

【００３８】

【実施例】

実施例1

以下の組成のマラリア原虫測定用試薬を調製した。

アクリジンオレンジ	3mg
トリシン	10mM
LTAC	1000mg
リン酸２水素ナトリウム	120mM
精製水	１Ｌ

NaOHでｐＨ９に調整

本発明試薬１ｍｌに抗凝固剤処理を行ったマラリア原虫（P. falciparum）培養赤血球を含む培養液１μｌを加え、35℃、30秒インキュベートした測定用試料をフローサイトメータ試作機で測定を行った。励起光源にアルゴンイオンレーザーを用い、488nmで励起を行い、前方散乱光および側方蛍光を測定した。図1に得られたスキャッタグラムを示す。デブリスの右側の蛍光強度の強い領域に集団が出現するのが確認された。また、同調培養によって生活史の各段階とスキャッタグラムとを比較したところ、分裂小体、輪状体、栄養体および分裂体の各段階をスキャッタグラム上で弁別することができた。

【００３９】実施例２

実施例１と同様の組成を用いて、抗凝固剤処理を行った健常人血液を同じように測定した場合のスキャッタグラムを図2に示す。実施例1で出現が確認された領域には、健常人ではドットが出現しないことが確認できた。

【００４０】実施例３

以下の組成のマラリア原虫測定用試薬を調製した。

アクリジンオレンジ	3mｇ
リン酸２水素ナトリウム	120mM
DTAB	10000mｇ
精製水	１Ｌ

ＮａＯＨでｐＨ７に調整

本発明試薬１ｍｌにマラリア原虫培養赤血球を含む培養液40μｌを加え、35℃、30秒インキュベートした測定用試料をフローサイトメータ試作機で測定を行った。励起光源にアルゴンイオンレーザーを用い、488nmで励起を行い、前方散乱光および側方蛍光を測定した。図3に得られたスキャッタグラムを示す。実施例1と同様にマラリア原虫を検出できることが確認できた。

【００４１】実施例４

以下の組成のマラリア原虫測定用試薬を調製した。

チアゾールオレンジ	3mg
クエン酸Ｎａ	80mM
DTAB	10000mg
精製水	1L

ＮａＯＨでｐＨ５に調整

本発明試薬１ｍｌに抗凝固処理を行ったマラリア原虫培養赤血球を含む培養液１μｌを加え、３５℃３０秒インキュベートした測定用試料をフローサイトメータ試作機で測定を行った。励起光源にアルゴンイオンレーザーを用い、488nmで励起を行い、前方散乱光および側方蛍光を測定した。図4に得られたスキャッタグラムを示す。実施例1と同じようにマラリア原虫を検出できることが確認された。

【００４２】

【発明の効果】本発明によれば、試料中のマラリア原虫を迅速かつ特異的に検出することができる。本発明の方法では測定用試薬と血液試料とを混合して約３０秒インキュベートするだけで遠心分離操作を行うことなく測定が可能である。

【００４３】また、本発明の方法ではマラリア原虫の生活史の分類が可能である。即ち、散乱光強度と蛍光強度の違いにより、分裂小体，輪状体，分裂体，生殖母体を弁別することが可能である。この生活史の分類を用いることによりスキャッタグラムの出現パターンから、末梢血において輪状体，生殖母体しか出現しない熱帯熱マラリアと、全ての生活史が出現する他の３種のマラリアとの弁別が可能である。とくに、熱帯熱マラリアは発症後すみやかに治療を開始することが必要なことから、本発明の方法により迅速に測定できることは、早期に診断をする上できわめて有用である。

【図面の簡単な説明】

【図１】本発明の実施例1の方法によるマラリア原虫培養赤血球を含む培養液を測定した緑蛍光強度－前方散乱光強度スキャッタグラムである。

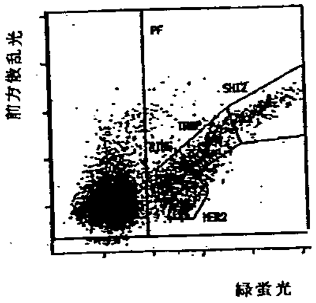
【図２】本発明の実施例2の方法による健常人の血液を測定した緑蛍光強度－前方散乱光強度スキャッタグラムである。

【図３】本発明の実施例3の方法によるマラリア原虫培養赤血球を含む培養液を測定した緑蛍光強度－前方散乱光強度スキャッタグラムである。

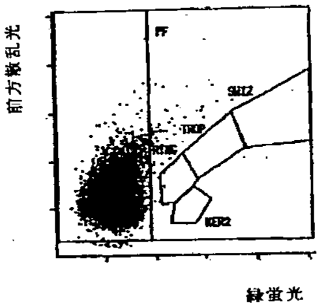
【図４】本発明の実施例4の方法によるマラリア原虫培養赤血球を含む培養液を測定した緑蛍光強度－前方散乱光強度スキャッタグラムである。

【図５】本発明の方法でマラリア原虫を測定したときのスキャッタグラムの摸式図である。

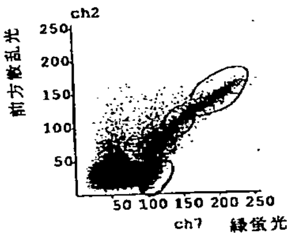
【図１】



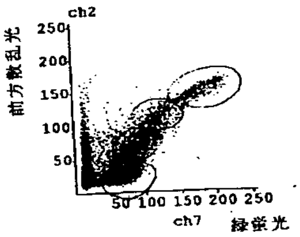
【図２】



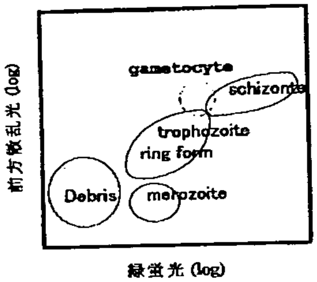
【図３】



【図４】



【図５】


gametocyte
schizonte
trophozoite
ring form
Debris
merozoite
前方散乱光 (log)
緑蛍光 (log)